

嫌気性菌のエネルギー代謝制御による 有用物質の効率的生産



中島田 豊

Efficient Production of Useful Compounds by Controlling Energy Metabolism of Anaerobic Bacteria

Yutaka Nakashimada (*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588*) *Seibutsu-kogaku* 85: 120-125, 2007.

1. はじめに

嫌気性微生物は好気性微生物とは異なり基質を完全に分解してしまうのではなく、アルコール、有機酸、バイオガスなどのさまざまな有用物に変換する。嫌気性微生物を用いた物質生産は古くから検討されており、酵母によるアルコール発酵はもちろんのこと、クロストリジウム属細菌を用いたアセトン・ブタノール発酵法、乳酸発酵法、そしてUASBリアクターを始めとする高速メタン発酵法が実用化されている。嫌気性微生物がこのような有機物をアルコールや有機酸に変換できるのは、そのエネルギー獲得機構に起因している。嫌気状態では微生物は基質レベルのリン酸化によりATPを生産する。その時生じたNAD(P)Hなどの中間電子受容体を再酸化し、生体内での酸化還元バランスを維持するために、水素、アルコール、有機酸などを生成する。したがって、嫌気性微生物による物質生産を効率化するためには、エネルギー代謝、つまりエネルギー(ATP)獲得のための基質代謝と中間電子受容体の酸化還元バランスの制御方法を知ることが非常に重要となる。筆者らは、嫌気性微生物のエネルギー代謝経路情報に基づいた培養条件の検討ならびに微生物育種を行うことにより嫌気性微生物による物質生産を制御できることを示した。これまでに行ってきた研究は3つの領域に分けられる(図1)。一つは、従

来から行われてきた純粋基質を用いた有用物質の発酵生産、次に、水素、メタンなどの生物学的エネルギー生産に関する微生物育種と最適培養法の開発、さらに、非糖質のガスや廃棄物を用いた有用物質生産である。次節以降、これらの研究内容について概略を述べたい。

2. 嫌気性微生物による光学活性物質の生産

2.1 光学活性2,3-ブタンジオール 2,3-ブタンジオールはインク、香水、殺虫剤、軟化試薬、爆薬、可塑性剤の原料であり、3種類の光学異性体が存在する。本研究で用いた*Paenibacillus polymyxa*は(2R, 3R)-2,3-ブタンジオールを98% ee以上の光学純度で生産し、医薬品や液晶といった付加価値の高い化合物の合成素材として利用される可能性を有している。本菌は嫌気条件下、グルコースを基質とした際、図2Aに示す混合有機酸発酵により2,3-ブタンジオールを生産し、副産物としてエタノール、乳酸、酢酸などを生産する。解糖系では1モルのグルコースから2モルのNADHが得られるが、2,3-ブタンジオールを生産した場合、このうち1モルしかNADHを再酸化できず、エタノール、乳酸などを副生することで還元当量のバランスを保つ。その結果として2,3-ブタンジオールの理論的的最大収率は副生成物がエタノールのみの場合で0.67 mol/mol グルコースとなる。2,3-ブタンジオール生産において還元当量のバランスは

mM, 硝酸濃度 100 mM の時の光学純度および収率はそれぞれ98.9%, ee, 64%であり, 最大生産物濃度は53 mMであった. 次にエステラーゼ阻害剤であるリン酸ビス(パラニトロフェニル)を0.1 mM加えて不斉還元反応を行ったところ, 収率は74% (12時間後), 生産物濃度は84 mMと改善された. 当不斉還元反応はグルコースなどの特別な電子供与体が必要でなく, 硝酸カリウムを添加しただけで反応が進むことから, 反応基質であるアセト酢酸エチル, アセト酢酸エチルがアセト酢酸へ加水分解するときに生じるエタノールもしくはアセト酢酸が電子供与体になると考えられた.

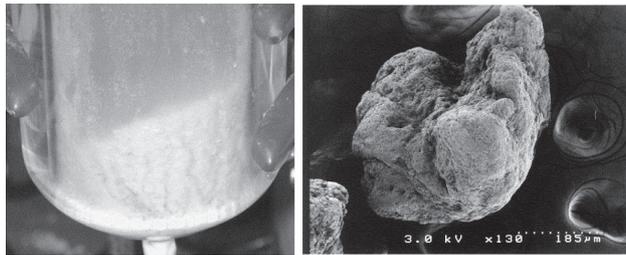
3. 発酵水素生産の効率化とその応用

水素エネルギーは次世代のクリーンエネルギーとしてその利用が多いに期待されている. 特に, 水素を直接の基質とする燃料電池の大幅な性能向上により, 家庭用燃料電池さらには燃料電池自動車を試作機段階を越えて実用化段階に達しつつある. 水素製造は, 天然ガスなどの化石燃料の熱分解による製造技術の研究開発が進んでおり, 現在開発中の燃料電池自動車の多くは本方式により水素を得ているが, 生物を活用した水素生産に関する研究も進展している. 生物的水素生産は, 主に光をエネルギー源として用いる光水素生産と, 有機物の嫌気代謝による発酵水素生産に大別できる. 光合成微生物は光エネルギーを利用して水素を生成できる. 一方, 発酵水素生産は, 糖質を中心とするさまざまな有機(廃棄)物から得た還元力を用いて光を使わずに水素を生産する. たとえば, グルコースを炭素源として用いた場合, 1モルのグルコースから, 理論上最大で4モルの水素が発生する. クロストリジウム属などの偏性嫌気性菌は比較的水素収率が高く, 多くの検討が行われてきたが^{6,7)}, 大腸菌や *Enterobacter* などの通性嫌気性菌は, 最大水素収率が2 mol/mol-グルコースと低いものの, 一般的に毒性が少なく取り扱いが容易であり, また水素による阻害が少なく培養が非常に簡単であるという特徴を持っていることから, 筆者らは当研究室で中温高速メタン発酵汚泥から高速水素生産菌として単離された *Enterobacter aerogenes* HU101 株をモデルとして水素生産効率化に関する検討を行った.

3.1 水素収率の向上 水素生産効率化を図るためには水素収率および生産速度の向上が重要な課題である. *E. aerogenes* HU101 株のグルコースの代謝経路は先の *P. polymyxa* とほぼ同じであり図2Aとして示される. グルコースは解糖系でピルビン酸に分解される. 水素はピルビン酸を基質としてピルビン酸-ギ酸リアーゼにより生成するギ酸からギ酸デヒドロゲナーゼ-ヒドロゲナー

ゼ複合体の作用により生成する. ギ酸と同時に生成するアセチル CoA からはエタノールまたは酢酸が生成する. その他, 水素生成に直接関与しない2,3-ブタンジオールと乳酸が生成する. このため, 野生株における水素収率は0.5 ~ 1 mol/mol グルコースと理論値よりもかなり低い. そこで筆者らは, 実規模での水素生産を考慮し従来の変異育種により水素高生産株を作製する方法を検討した. 水素生産を低下させる要因である乳酸および2,3-ブタンジオール生産能を抑制または欠損させた変異株を取得するため, 野生株を変異処理した後, まず有機酸生成による pH 低下により顕著に増殖を阻害できるプロトン自殺法を用いて有機酸生成抑制変異株を取得し, 水素収率が向上したことを確認した. さらに, アルコールデヒドロゲナーゼ発現菌がアリルアルコールを取り込み, 有毒なアクロレインを生産し死滅することを利用したアリルアルコール法を用いアルコール生成抑制株を選抜したところ, やはり水素収率は向上した. そこで, この二つの選抜法を組み合わせた二重変異株 AY-2 株を作製したところ, グルコース1モルあたりの水素生産収率は最高で野生株の約2倍である1.5モルに向上した⁸⁾. また興味深いことに, この二重変異株は水素生産経路に關与するエタノールおよび酢酸生成も阻害されており, これまでの知見からは水素生成は期待できない. 筆者らは *E. aerogenes* はギ酸経路だけではなく解糖系で生成する NADH からも水素を生成できるのではと考え, 細胞抽出液を用い NADH を電子供与体としたところ, 確かに水素生成が起こることを確認した⁹⁾. さらに水素生成は細胞膜画分でのみ起きることから酵素は細胞膜に局在することが予想された. *E. aerogenes* が NADH から水素を生産可能であれば, 最大水素収率は4 mol/mol グルコースとなりクロストリジウム属細菌と同じとなることから, さらに詳細な検討を進めている. また同時にギ酸経路での水素収率向上に対する試みも引き続き行い, ダイアセチル, アセトイン検出法である Voges-Proskauer (VP) 法を用いて2,3-ブタンジオール非生成変異株を作製したところ, その中で2,3-ブタンジオールのみならず同時に乳酸生成も欠損した VP-1 株を取得できた. 本変異株は, ギ酸の一部蓄積が見られたものの, 理論的最大収率とされる2 mol/mol グルコースの水素 + ギ酸収率をほぼ達成した¹⁰⁾.

3.2 水素生産速度の向上 培養槽の小型化は水素・メタン発酵に限らず, システムの初期製造コストを低減するために非常に重要な課題である. 小型化のためにはリアクター体積あたりの水素生産速度はできる限り高いほうが良い. その方策としては, 先に述べた収率をあげることの他に, 菌体を適当な担体に固定化することによ



(A) リアクター下部の凝集菌体 (B) 凝集菌体SEM写真

図3. *Enterobacter aerogenes* 自己凝集菌体

り高密度化した固定床プロセスが適当ではないかと考えた。そこで筆者らは各種担体を用いて *E. aerogenes* HU-101 株による水素生産を検討していた。その過程で、本菌が担体に付着するのみならず、リアクター底部に顆粒状に凝集することを発見した(図3)。微生物顆粒による菌体の高密度化は高速メタン発酵法で大いに利用されている通り、水素生産速度の大幅な向上が期待できた。そこで本菌の自己凝集性を利用した固定床リアクターによる水素生産を検討した。グルコース 15 g/l、完全合成培地で徐々に滞留時間を下げて培養を続けたところ、期待通り自己凝集菌体リアクター内部に貯留され、滞留時間 1.5 時間の条件で 30 mmol/l/h の水素生産速度が得られた。さらに、水素収率を向上させた変異株 AY-2 を用いた場合、同じ 1.5 時間の滞留時間で 58 mmol/l/h の連続水素生産が可能であった¹¹⁾。

3.3 バイオディーゼル製造工場廃液からの水素-エタノール生産 *E. aerogenes* HU101 株を用い、糖および糖アルコールなどさまざまな炭素源からの水素生産を検討したところ、重量あたりの水素収率は概ね炭素源の還元度に比例し、検討した中ではグリセロールが非常に良い基質であることがわかった⁹⁾。同時に、グリセロールを用いた場合、水素の他に副産物としてエタノールのみの生産が可能であることが期待された。なぜなら、グリセロールはグリセルアルデヒド 3 リン酸を経由して解糖系に入り代謝されるが、この時 1 モルグリセロールから 2 モルの NADH と 1 モルのアセチル CoA が生成する。そして 2 モルの NADH がアセチル CoA からのエタノール生成に用いられることにより、炭素バランスおよび還元力バランスが満たされるからである。そこで、グリセロール 10 g/l を基質として先と同様、HU-101 株凝集菌体を用いた連続水素発酵を行ったところ、滞留時間を 50 分(希釈率 1.2 時間)としても基質はほぼ完全に消費され、80 mmol/l/h での高速水素生産速度、0.8 mol/mol のエタノール収率が得られた¹²⁾。理論上のエタノール収率は 1 mol/mol グリセロールであるが、1,3-プロパンジオールが副生したためエタノール収率は低下した。

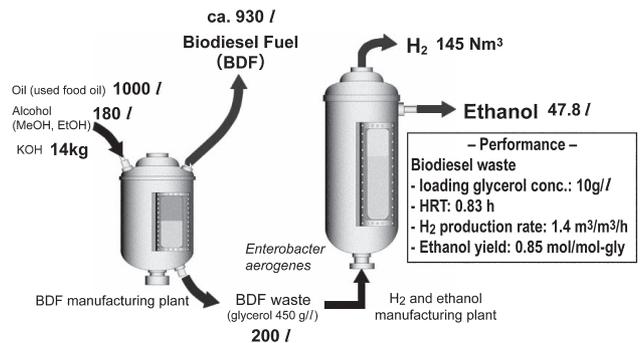


図4. バイオディーゼル製造工程で排出されるグリセロール含有廃液からの *E. aerogenes* を用いた水素-エタノール生産フロー

上記の通り、グリセロールからは現在、クリーンなエネルギーとして、また自動車燃料として大いに期待されている水素とエタノールを同時に生産しうるすぐれた基質であることはわかったが、問題はその供給源であった。筆者らは廃食用油などからつくられるバイオディーゼル製造において脂肪酸のメチルエステル化後に発生する高濃度グリセロールを含む廃液に着目し、水素-エタノール同時発酵法による廃食用油の完全エネルギー化を検討した。その結果、廃液中に含まれる油分により微生物凝集顆粒が浮上、流れ出してしまうため固定化担体を導入する必要はあったものの、廃液を用いた場合でも 60 mmol/l/h の水素生産速度、エタノール収率 0.85 mol/mol グリセロールでの連続生産が可能であることを示した。図4に廃食用油からのバイオディーゼル燃料、水素、そしてエタノール生産のマスフローを示す。廃食用油 1000 l から、約 930 l のバイオディーゼル燃料と 200 l のグリセロールを含む廃液ができる。廃液からは 145 m³ の水素、そして約 50 l のエタノールが生産できる計算となる。エタノールは廃食用油のエチルエステル化に利用しても良いし、エタノール燃料としてそのまま利用しても良い。問題点としては、使用できるグリセロール濃度が低いため最終エタノール濃度が低く、エタノール精製工程でのコスト高が懸念される。今後、高濃度グリセロール含有廃液に対する耐性株の取得が急務である。しかし、バイオディーゼル燃料生産の拡大が予想されるとともに、化粧品産業などからの低精製度のグリセロールの排出も期待でき、今後グリセロール含有廃液の有効活用法として本成果が広まることを期待している。

3.4 水素-メタン二段発酵 これまで述べてきた通り、有機物からの水素生産においては必ず有機酸やアルコールなどが排水中に副産物として残るので、その有効活用法も考えなければならない。筆者らはこれまでにセルロースや汚泥などさまざまな炭素源、有機廃棄物のメタン発酵法を検討してきたが¹³⁻¹⁶⁾、水素生産時に排出

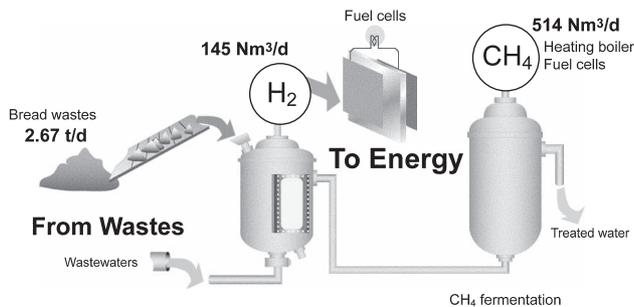


図5. 製パン工場から排出される廃パン生地の水素-メタン二段発酵フロー

される有機酸やアルコールはメタン発酵における非常に良い基質であることから、水素生産槽の後にメタン発酵槽を設置した水素-メタン二段発酵を提案し、実際にどの程度のエネルギー回収が図れるかを、製パン工場廃棄物を用いて検討した^{17,18)}。廃棄物排出量を一日あたり約2.7トンとし、これを水素発酵すると1日あたり145 Nm³の水素を生産できる(回分培養結果に基づき計算)。得られた水素を燃料電池により電力に変換すると(変換効率50%と仮定)214 kWhの電力が得られる。これは、25～30家庭分の1日の電力消費量に相当する。さらに処理水を高速メタン発酵法で処理すると1日あたり514 Nm³のメタンが得られる。これは重油換算で約530 lに相当し、製パン工場一日あたりの重油消費量の1/4を賄える計算になる(図5)。

4. 水素を電子供与体とした酢酸、エタノール生産

近年、バイオマスの有効利用が検討されており、糖化可能なバイオマスからのアルコールや有機酸などへの微生物変換が試みられている。一方で、国内の生物系廃棄物の約8割を占める糖化が難しいバイオマスは、水素、メタン発酵などの微生物変換によるガス化、あるいは、直接燃焼や熱化学的変換によるガス化が中心に検討されている。回収されたガスは、ボイラー燃料や燃料電池などへの利用が検討されているが、さらに、アルコールや有機酸生産などの原料として利用できれば、新規有用物質生産法として提案できる。筆者らは、これまでに水素と二酸化炭素を資化し、酢酸を生産する*Acetobacterium*属細菌に関する研究を行ってきており^{19,20)}、酢酸は簡単に製造可能であることはわかっていた。そこで、さらに付加価値の高い化合物として酢酸の還元物質であるエタノールに着目した。これまで、合成ガスからの中温微生物によるエタノール生産の検討はすでに行われていたが、筆者らは、培養と回収を同時に行えるなどメリットの多い好熱性細菌を用いたH₂-CO₂からのエタノール生産を検討することにした。そこで、まず新規にエタノール生産

菌としてHUC22-1株を単離・同定するとともにエタノール生産経路の解析を行った²¹⁾。次に、培養工学的手法と代謝工学的手法を用いたH₂-CO₂からのエタノールおよび酢酸の高生産化を検討した²²⁾。

4.1 HUC22-1株の同定、エタノール生産経路の解析

水素をエネルギー源、CO₂を炭素源として温泉源泉や地下水などさまざまなサンプルを集積培養し、エタノール生産を確認後、ロールチューブ法によりH₂-CO₂資化性菌を単離したところ、地下温水源の汚泥サンプル由来HUC22-1株が見いだされた。本菌はグラム陽性、芽胞形成能を持つ偏性嫌気性細菌で、45～65°C、pH 4.5～7.5において生育が可能であった。さらに、16S rRNA 遺伝子、基質資化性の特徴よりアセチルCoA経路により水素をエネルギー源、炭酸ガスを炭素源として成育する*Moorella* sp.と同定した。H₂-CO₂を用いた回分培養では260 mMの水素、120 mMのCO₂を消費し、エタノール1.5 mMを生産した。少量とはいえ、これは好熱性細菌がH₂-CO₂からエタノールを生産できることを示した初めての例である。一方、フルクトースを用いた回分培養では酢酸を生産したが、エタノールは検出されなかった。本菌は、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)活性、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ACDH)活性を有しており、H₂-CO₂を用いた場合、フルクトースよりも上記酵素活性が高かった。またADH、ACDHの補酵素と考えられるピリジヌクレオチドの細胞内プール量を調べたところ、H₂-CO₂培養ではフルクトース培養よりも合計プール量は小さいが、NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺の比率が高かった。このことからH₂-CO₂培養とフルクトース培養におけるエタノール生産の違いは、酵素活性および補酵素の酸化還元バランスが影響していると示唆された。

4.2 培養条件の改良によるエタノールおよび酢酸の高生産

初発pHを6.2とした回分培養では、培養中pHは4.5まで低下し増殖停止した。酢酸濃度およびpHが比増殖速度に及ぼす影響について検討を行ったところ、以前の研究で超好熱性始原菌*Pyrococcus furiosus*に見られたのと同様²³⁾、H₂-CO₂およびフルクトースともにpHが低くなるに従って、酢酸阻害が強くなることが示された。さらに、得られた結果をpHによる阻害を考慮した非拮抗阻害モデルに当てはめて解析を行ったところ、非解離型の酢酸が阻害の本体であることが示された。この時、阻害定数はH₂-CO₂培養(164 mM, pH 6.2)の方がフルクトース培養(108 mM, pH 6.2)より約1.5倍高く、H₂-CO₂培養において酢酸をより高濃度に生産できる可能性が示された。

次に、エタノールまたは酢酸生産に適したpHを得る

ため、pH制御およびH₂-CO₂の連続供給が可能なりアクターシステムを構築した。H₂-CO₂培養において、pHを5.0から7.6の範囲で一定に制御して培養を行った結果、pH無制御と比較して、pH 6.2の時に菌体は4.4倍の0.92 g/l、酢酸は6.8倍の339 mMと最大値を示した。エタノール生産はpH 5.8の酸性側で増加が見られ、pH 6.2の回分培養と比較して4倍の5.2 mMと最大値を示した。一方、フルクトース培養においてはH₂-CO₂培養よりも酢酸生産が低かった。さらに、酢酸を低濃度に保つために菌体の回収、再利用を伴う反復回分培養をpH 6.2および5.8一定制御下で行ったところ、pH 6.2制御時、菌体濃度は1.5 g/lに達し、酢酸は840 mmol/l-reactor生産されたがエタノール生産量は低かった。一方、pH 5.8制御の時、エタノール生産は増加し、最終的に15 mmol/l-reactorが生産された。

以上のように培養条件の最適化によりエタノール生産量は向上したものの、まだまだ濃度としては低く、実生産にはほど遠いのが実情である。そこで、HUC22-1株のエタノール生産経路を増強するために、H₂-CO₂代謝時の主要中間代謝産物であるアセチルCoAを直接の基質としてエタノール生成に関与すると考えられる酵素遺伝子を複数クローニングし、大腸菌内での発現に成功した²⁴⁾。この組換え酵素とNADHなどの補酵素を加えることにより、アセチルCoAからのエタノール生成を確認している。今後、HUC-221株への遺伝子導入法を確立し、クローニングした酵素遺伝子群を導入することにより、さらなるエタノール生産性の向上が見込まれる。

5. おわりに

嫌気性微生物は培養が難しい、特別な装置を必要とするなどと思われがちであり、伝統的な発酵および嫌気性廃水処理分野を除き、その利用は未だ発展途上と言える。しかし、地球上の大部分は嫌氣的であり、さらにユニークで有用な微生物が発見される可能性は高い。そのような微生物の代謝系を生かしたモノづくりの技術が、研究レベルに留まるのではなく実社会で広く活用されるように、今後とも生物学と工学の両面から積極的にアプローチしてゆきたい。

最後に、本研究は全て広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻代謝変換制御学研究室において実施された。当研究室で研究を行うに当たりさまざまな御指導・御支援頂いた西尾尚道教授、柿菌俊英助教授、そして共同で研究を遂行してくれた学生諸氏に深く感謝申し上げます。また、本賞候補として御推薦頂いた広島大学山田隆教授、加藤純一教授、そして御審査頂いた諸先生方に感謝申し上げます。さらに研究遂行に当たり数多くの御助言、御助力を頂いた諸先生ならびに共

同研究者の方々に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nakashimada, Y., Kanai, K., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **20**, 1133–1138 (1998).
- 2) Nakashimada, Y., Marwoto, B., Kashiwamura, T., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 661–664 (2000).
- 3) Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **24**, 109–114 (2002).
- 4) Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 112–119 (2004).
- 5) Nakashimada, Y., Kubota, H., Takayose, A., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 368–372 (2001).
- 6) Taguchi, F., Mizukami, N., Hasegawa, K., and Saito-Taki, T.: *Can. J. Microbiol.*, **40**, 228–233 (1994).
- 7) van Niel, E. W. J., Budde, M. A. W., de Haas, G. G., van der Wal, F. J., Claassen, P. A. M., and Stams, A. J. M.: *Int. J. Hyd. Ener.*, **27**, 1391–1398 (2002).
- 8) Rachman, M. A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 358–363 (1997).
- 9) Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Int. J. Hyd. Ener.*, **27**, 1399–1405 (2002).
- 10) Ito, T., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 227–232 (2004).
- 11) Rachman, M. A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 450–454 (1998).
- 12) Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 260–265 (2005).
- 13) Nagai, H., Kobayashi, M., Tsuji, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Water Sci. Technol.*, **45**, 335–338 (2002).
- 14) Nakashimada, Y., Kartikeyan, S., Murakami, M., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **22**, 223–227 (2000).
- 15) Takeno, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 280–285 (2001).
- 16) Nishio, N. and Nakashimada, Y.: *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, **90**, 63–87 (2004).
- 17) 中島田豊, 西尾尚道: FFI ジャーナル, **208**, 703–708 (2003).
- 18) 西尾尚道, 中島田豊, 沖 泰弘, 三谷 優: クリーンエネルギー, **14**, 55–59 (2005).
- 19) Bainotti, A. E., Futagami, K., Nakashimada, Y., Chang, Y.-J., Nagai, S., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **19**, 989–993 (1997).
- 20) Bainotti, A. E., Yamaguchi, K., Nakashimada, Y., and Nishio, N.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 223–229 (1998).
- 21) Sakai, S., Nakashimada, Y., Yoshimoto, H., Watanabe, S., Okada, H., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1607–1612 (2004).
- 22) Sakai, S., Nakashimada, Y., Inokuma, K., Kita, M., Okada, H., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 252–258 (2005).
- 23) Nakashimada, Y., Nakae, K., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 149–154 (1999).
- 24) Inokuma, K., Nakashimada, Y., Akahoshi, T., and Nishio, N.: *Arch. Microbiol.*, in press.